UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

ANNÉE 1947 N° 41

CONTRIBUTION

à l'étude de la recherche des microbes anaérobies dans les eaux d'alimentation

THÈSE

POUR LE DOCTORAT EN MÉDECINE

(DIPLOME D'ÉTAT)

Présentée et soutenue publiquement en juin 1947

PAR

JEAN ESQUIROL

MEMBRES DU JURY

MM. ANDRIEU — *Président.*
DARNAUD, LAPORTE, BOUNHOURE, DARDENNE — *Assesseurs.*

TOULOUSE
IMPRIMERIE CLÉDER
28, RUE DE LA POMME, 28

1947

CONTRIBUTION

à l'étude de la recherche des microbes anaérobies dans les eaux d'alimentation

UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

ANNÉE 1947 N° 41

CONTRIBUTION

à l'étude de la recherche des microbes anaérobies dans les eaux d'alimentation

THÈSE

POUR LE DOCTORAT EN MÉDECINE

(DIPLOME D'ÉTAT)

Présentée et soutenue publiquement en juin 1947

PAR

JEAN ESQUIROL

MEMBRES DU JURY

MM. ANDRIEU — *Président.*
DARNAUD, LAPORTE, BOUNHOURE — *Assesseurs.*
DARDENNE

TOULOUSE
IMPRIMERIE CLÉDER
28, RUE DE LA POMME, 28

1947

UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

TABLEAU DU PERSONNEL

DOYEN	MM. CALVET.
ASSESSEUR	LEFEBVRE
Doyens honoraires	BARDIER.
	GORSE.

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. DALOUS	MM. RISPAL	MM. MOOG	MM. MAURIN
ESCAT	LAFFORGUE	MERIEL	RIBAUT
	ARGAUD	CAUBET	SERR

PROFESSEURS

Anatomie	MM. CLERMONT
	VALLOIS
	TAPIE (J.)
Clinique médicale	ROQUES.
Clinique chirurgicale infantile et orthopedie	BOULARAN.
Clinique chirurgicale et gynécologique	LEFEBVRE.
Clinique médicale infantile et puériculture	SOREL.
Clinique de neurologie et de psychiatrie	RISER.
Clinique ophtalmologique	CALMETTES.
Physique biologique et médicale	BUGNARD.
Chimie et Toxicologie	BRUSTIER.
Hydrologie thérapeutique et climatologie	MERIEL (P.).
Pharmacie	CAUJOLLE.
Matière médicale	VINCENT
Clinique obstétricale	GARIPUY.
Physiologie	SOULA.
Clinique chirurgicale et du Cancer	DUCUING.
Clinique des maladies des voies urinaires	FABRE (P.).
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques	NANTA.
Pathologie générale et médecine expérimentale	SENDRAIL.
Histoire naturelle	DELAS.
Médecine légale et Déontologie	PLANQUES
Bactériologie, hygiène, médecine sociale	ANDRIEU.
Anatomie pathologique	FABRE (J.)
Clinique O.R.L. et de chirurgie maxillo-faciale	CALVET
Chimie biologique	MONNIER (P.)
Histologie et Embryologie	BROUSSY.
Pathologie interne	MOREL

PROFESSEURS SANS CHAIRE

Physiologie	BAISSET
Obstétrique	GUILHEM
Anatomie	COULOUMA

COURS COMPLÉMENTAIRES

Cours d'obstétrique aux élèves sage-femmes	MM. GARIPUY.
Cours d'anatomie physiologique et pathologie élémentaire aux élèves sages-femmes	GUILHEM.
Chimie pathologique	VALDIGUIE (P.).
Chimie biologique	VALDIGUIE (P.)
Chimie minérale	BLANC.
Odonto-Stomatologie	CADENAT.
Physique pharmaceutique	AUVERGNAT
Dermatologie et Syphiligraphie	BAZEX
Législation pharmaceutique	BOUISSET.
Microbiologie et hygiène pharmaceutique	BOUISSET.
Clinique de la Tuberculose	MOREL DAMBRIN (P.)
Neuro-chirurgie	LAZORTHES.
Parasitologie	LASSERRE
Botanique et Cryptogamie	Mme DULUCQ-MATHOU.
Chimie analytique	MM. BLANC.
Hydrologie et géologie	ASTRE.
Médecine Sociale et du Travail et Assurances Sociales	BOUNHOURE
Anatomie médico-chirurgicale	THOMAS.
Pharmacodynamie	BOUNHOURE
Bactériologie et Hygiène	LAPORTE
Clinique O.R.L.	CLAUX
Chirurgie pulmonaire	DAMBRIN (P.)
Urologie	LHEZ
O. R. L.	CLAUX

AGRÉGÉS EN EXERCICE

Histologie	MM. BIMES
Médecine	GADRAT
	DARNAUD
	GERAUD
	DARDENNE
	LAPORTE
Anatomie	LAZORTHES
Chirurgie	VIRENQUE
	GRIMOUD
	RIEUNAU
	DIEULAFE
	DAMBRIN (P.)
Physique médicale	MARQUES
Chimie médicale	VALDIGUIE (P.)
Chimie générale phamaceutique	BLANC
Pharmacie	COUTURIER
Ophtalmologie	DEODATI
Histoire naturelle et pharmaceutique	Mme DULUCQ-MATHOU
Secrétaire de la Faculté	DUCROS

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

La Faculté déclare n'être pas responsable des opinions émises par les candidats.
(Délibération en date du 12 mai 1891)

A LA MEMOIRE DE MA MERE

Sa bonté, sa douceur, son indulgence demeureront éternellement dans mes souvenirs.

Qu'elle trouve ici le gage de ma tendresse jamais disparue.

A LA MEMOIRE DE MES GRANDS-PARENTS

A MA FEMME

En témoignage de tout mon amour et de confiance en l'avenir.

A MA GRAND'MERE

Qui a tant espéré ce jour, en témoignage de reconnaissance et d'affection.

A MON PERE

Chevalier de la Légion d'Honneur
Croix de Guerre

Qui a su me soutenir dans les moments difficiles et m'a permis de terminer les études médicales.

Je dédie ce modeste travail, faible gage de ma très sincère affection filiale.

A MA SŒUR

Qui m'a été si précieuse ces dernières années, en témoignage de reconnaissance et de très grande affection.

A MON PARRAIN

Avec toute ma gratitude.

A MON ONCLE LE DOCTEUR A. FERRE

A MES TANTES

A MES ONCLES

A MA COUSINE

A MES COUSINS

A MES BEAUX-PARENTS

En témoignage de reconnaissance et de sincère affection.

A MA BELLE-SŒUR

A MON BEAU-FRERE

MEIS ET AMICIS

A NOTRE MAITRE ET PRESIDENT DE THESE

MONSIEUR LE PROFESSEUR ANDRIEU

Professeur d'hygiène, bactériologie et médecine sociale

Qui nous a consacré des moments précieux et nous a conseillé dans la rédaction de cette thèse.

La bienveillance qui nous a toujours accueilli dans son service et dans le laboratoire de bactériologie ne saurait jamais être assez remerciée.

En témoignage de respectueuse reconnaissance.

A Monsieur le Professeur DARNAUD

Chez qui nous avons trouvé beaucoup de sollicitude.

En témoignage d'estime et de reconnaissance.

A Monsieur le Professeur LAPORTE

Qui nous a toujours témoigné une grande sympathie et qui nous a fort honoré en acceptant de faire partie de notre jury de thèse.

A Monsieur le Professeur BOUNHOURE

Qui nous a toujours si bien accueilli dans son service et donné des conseils éclairés.

Avec toute notre gratitude

A NOS AMIS ET CAMARADES D'ETUDES

A NOS MAITRES D'HOPITAL

A NOS MAITRES DE FACULTE

A NOS CHEFS DE LABORATOIRE

Monsieur le Docteur AVERSENQ

Madame le Docteur ENJALBERT

Monsieur le Docteur LEVRAT

Monsieur le Docteur MONNIER

En témoignage de reconnaissance et d'estime pour toute leur sollicitude et leurs conseils éclairés.

Introduction

« L'analyse bactériologique de l'eau se propose d'estimer l'importance de son peuplement microbien, de qualifier les espèces rencontrées (en particulier celles dont l'habitat ordinaire est l'organisme humain et qui ne sont qu'en transit dans l'eau) et d'en déduire ainsi le degré de potabilité de celle-ci ».

Nous avons placé cette définition de M. A. Guillerd en tête de notre étude car elle résume en quelques lignes le plan que doit suivre tout bactériologiste s'attaquant au problème de l'analyse de l'eau.

De nombreuses méthodes ont été préconisées pour identifier les germes pathogènes ou non, pullulant dans toutes les eaux. Mais très vite on a remarqué que parmi tous ces microbes, seule l'étude d'un certain nombre présenterait de l'intérêt. Notre but n'est pas, dans cet ouvrage, de reprendre les différentes techniques proposées par les auteurs, d'en énumérer les défauts et les qualités.

Comme on le sait actuellement, toutes ces méthodes sont orientées vers un seul problème : la

valeur de la présence et du nombre des bacilles coliformes présents dans l'eau. Que ce soit en France avec la méthode de H. Vincent, le procédé de Besson ou de Diénert, en Amérique avec une technique en trois temps (test présomption, test confirmatif, test complet) la pureté bactériologique de l'eau se résume, répétons-le, à la mise en évidence et à la numération du colibacille.

Cependant, si nous mettons à part la recherche de telle ou telle Salmonella ou Shigella mise en cause au cours d'une épidémie, disons que ce n'est qu'exceptionnellement que l'on s'arrête sur d'autres examens tels que la recherche des streptocoques fécaux, des protozoaires, des anaérobies.

Ce dernier chapitre est particulièrement sujet à controverses. Et cependant, Vincent, dès 1905, reconnaissait « qu'en négligeant la recherche des anaérobies, l'étude bactériologique des eaux se privait d'un élément d'appréciation d'un réel intérêt. Les eaux adultérées diffèrent, en effet, sensiblement à cet égard des eaux pures. Alors que dans ces dernières le nombre de germes anaérobies stricts (les anaérobies facultatifs étant laissés de côté) est extrêmement rare ; au contraire, les eaux soumises aux infiltrations des matières fécales, fumiers, putréfaction, renferment une quantité beaucoup plus élevée de microbes anaérobies. Il ne faut donc pas séparer, concluait l'auteur dans l'expertise bactériologique des eaux, les différents éléments d'appréciation que l'on peut tirer du nombre de bacillus coli qu'elles renferment, de la présence des microbes de la putréfaction, enfin de celle des bactéries anaérobies stricts, toujours d'autant plus que l'eau est adultérée. »

La question a été depuis souvent mise à l'ordre du jour. En France, à l'étranger, on a mis au point des méthodes de recherches tout en essayant de donner des résultats tangibles.

Notre but, quant à nous, se bornera, après un large tour d'horizon, à tirer une conclusion logique relevant de l'état actuel des recherches.

Le plan que nous suivrons est en somme très simple : après un rappel historique des principales voies où s'est engagée la recherche des microbes anaérobies de l'eau, nous consacrerons un chapitre à l'étude du bacille Perfringens dont la connaissance nous sera fort précieuse pour la suite de notre exposé, car c'est pratiquement à ce germe que se résume l'étude des anaérobies dans l'eau.

C'est alors que nous envisagerons les différents travaux qui ont contribué à l'analyse bactériologique de ces microbes dans les eaux d'alimentation.

Nous étudierons d'abord les principes généraux sur lesquels reposent cette étude.

Puis, nous passerons en revue les techniques spéciales proposées par les auteurs.

Nous tâcherons, enfin, dans un dernier chapitre, de tirer la conclusion de cet enseignement et de savoir si la recherche de ces germes présente l'intérêt que certains disent devoir y trouver.

Avant de commencer l'exposé de cette étude, nous tenons particulièrement à remercier le service du laboratoire de bactériologie et d'hygiène pour l'aide qu'ils nous a apportée.

Nous devons tout d'abord remercier M. le Professeur Andrieu qui nous a donné l'idée de ce travail et nous a guidés dans nos recherches.

Nous adressons également nos vifs remerciements à M^me^ Enjalbert, qui nous a toujours témoi-

gné beaucoup d'intérêt, nous a donné de justes conseils et suggéré maintes corrections utiles.

Nous exprimons, en outre, notre reconnaissance à MM. Aversenq, Levrat, Monnier, auprès de qui nous avons toujours trouvé beaucoup de sollicitude et des conseils éclairés.

Qu'ils trouvent ici l'expression de notre gratitude.

Historique

C'est en 1905 que H. Vincent, dans un exposé sur la signification particulière du bacillus coli, montra l'intérêt qu'il y aurait d'associer dans la recherche de ce germe celle des microbes de la putréfaction et des anaérobies. L'auteur constate qu'il y a rarement contradiction entre ces trois recherches. Une eau pure ne doit pas renfermer d'espèces anaérobies stricts et la présence de quelques dizaines par centimètre cube révèle une pollution, car ces germes sont les hôtes habituels du tube digestif.

En 1906, A. Guillemard, poursuivant l'étude de cette question, reconnaissait que la recherche dans l'eau des germes vivant à l'abri de l'air était presque complètement négligée. L'auteur a pu montrer par une méthode personnelle que ce qui le frappait le plus dans ses résultats était la forte proportion de germes anaérobies dans la flore intestinale. Guillemard avait constaté la contamination de l'eau dans la Seine, d'abord avant l'entrée du fleuve dans Paris, puis à la sortie, où la teneur en anaérobies était passée de 1.800 à 5.600. Etudiant le rapport aérobies-anaérobies dans les eaux de la

Marne, il constate qu'après filtration les anaérobies ont disparu beaucoup moins vite que les aérobies puisqu'ils demeuraient proportionnellement quatre fois plus nombreux dans l'eau épurée (347/86). D'où la conclusion de l'auteur de chercher à améliorer le travail de l'épuration en portant son attention sur la teneur des eaux en anaérobies.

Un essai de différenciation fut tenté par E. Klein qui se basait sur les travaux de Metchnikoff sur la flore intestinale ; ceux-ci montraient la présence constante dans les selles du bacillus entéridis sporogènes, espèce anaérobie strict. M. Henseval, reprenant la question, recherche ce germe par la coagulation du lait et analyse les eaux d'huîtrières. Il trouve ce microbe en grande abondance dans les parcs à huîtres contaminés, et accompagnant toujours le colibacille.

Mais, parmi toutes les espèces anaérobies du tube digestif, Imbaux fit remarquer que la recherche de ces germes dans l'eau doit se borner pratiquement à l'étude du bacille perfringens.

Pourquoi cette remarque ? La première raison venait du fait que ce bacille est un hôte normal de l'intestin et accompagne le colibacille dans l'eau contaminée, la deuxième venait de la découverte de Neuberg et Nord en 1913, qui montraient que le bacille perfringens réduisait le sulfite de soude en sulfure. Wilson et Blair, utilisant cette remarque, ont préparé un milieu où cette réduction se fait en présence de fer ce qui conduit à l'obtention de colonies s'entourant d'une auréole noire-verdâtre, propriété commune à la plupart des anaérobies. Le bacille perfringens, ainsi que quelques autres espèces anaérobies (bacillus fallax, le vibrion septique, le bacillus chauvei), développent

les mêmes colonies. Aussi, pratiquement, toutes les colonies noires que l'on obtient peuvent être considérées comme formées par le bacille perfringens.

Depuis la découverte du milieu de Wilson et Blair, les techniques employées pour déceler la présence du bacille perfringens dans l'eau ont peu varié. Toutes se sont efforcées de réaliser une simplification de la méthode.

Zyp, Budakov et Mischne, tout en conservant le même milieu, réduisent d'un tiers les quantités de sulfure et de chlorure de fer employées.

V. Marino, en 1934, utilise des quantités déterminées d'eau suspecte qu'il ensemence en tubes de gélose profonde et déduit exactement par le nombre des colonies noires obtenues les conditions de potabilité de l'eau.

Par la suite, les auteurs se sont surtout attachés à montrer l'intérêt qu'il y aurait à associer la recherche du bacille perfringens à celle du colibacille.

Dienert et Guillerd montrent que ce bacille existe dans les eaux d'égoût, les rivières et les sources contaminées. Si l'on a donc affaire à une eau nouvelle qu'on se propose de capter, on devra effectuer la recherche des anaérobies.

En 1939, P. Ambrozioni signale que dans une canalisation d'eau de ville le bacille perfringens avait été longtemps, par sa grande vitalité, le seul indice de contamination de l'eau.

Le bacille Perfringens

Prenant comme test de base le nombre de germes appartenant à l'espèce perfringens puisque celle-ci est, au même titre que le colibacille, d'origine fécale, Ambrozioni cite, à l'appui, l'exemple d'une eau sulfureuse dont les conduites avaient subi une détérioration (les joints d'étoupes non goudronnés étaient devenus perméables aux infiltrations).

L'auteur a trouvé un chiffre élevé de pollution par le bacille perfringens et celui-ci est demeuré longtemps à l'état vivant dans cette eau. Dans une autre étude, Imbeaux avait signalé le fait en disant que le bacille perfringens accompagne très souvent le colibacille et qu'il est, au même titre que ce germe, l'indice d'une eau contaminée.

Si nous ouvrons les traités sur l'analyse des eaux, nous voyons qu'en ce qui concerne l'anaérobiose, seul le bacille perfringens a été étudié.

Nous croyons donc utile de rappeler brièvement quelques-unes des propriétés de ce germe dont la recherche sera notre principale occupation au cours de ce travail.

Découvert par Achalme, retrouvé par Welch et Nuttal qui ont remarqué son rôle en pathologie humaine, le bacille perfringens doit son nom aux travaux de Weillon et Zuber.

C'est un germe très répandu dans la nature : on le trouve dans l'air, les poussières, la terre, le fumier, les eaux d'égoût, les eaux des ruisseaux, les rivières, les légumes, les aliments, le lait frais, le lait condensé, les fromages, les conserves, la viande de bœuf, les coquillages. On conçoit, après cette énumération, que certains auteurs le placent par sa présence dans l'eau au même titre que le colibacille, car il n'est pas étonnant que l'homme et les animaux respirant l'air et les poussières, avalant les aliments crus et les liquides, hébergent cette espèce anaérobie et le disséminent par les matières fécales.

Morphologiquement, c'est un bâtonnet court, trapu, aux extrémités à peine arrondies ; il se groupe soit par paire, soit dans le prolongement l'un de l'autre. Enfin, il n'est pas exceptionnel de trouver deux éléments formant un angle de quarante-cinq degrés. Il produit des spores en milieu alcalin ou neutre. Il résiste à une haute température, ce qui permet de le différencier des autres germes.

Sur gélose Veillon, il présente un aspect caractéristique. Les colonies ont l'apparence de disques biconcaves semblables au disque à lancer de l'athlète. Au bout de peu de temps, la gélose se fragmente, explosant littéralement sous l'action des dégagements du gaz qu'il provoque.

Sur gélatine glucosée, la liquéfaction est lente et incomplète.

En bouillon, le liquide se trouble uniformément : il se forme lentement en quelques jours un dépôt dans le fond du tube. Si l'on débouche le tube, on est frappé par l'odeur butyrique qui se dégage.

Sur lait, et nous nous permettons d'insister sur ce caractère car il est nettement différentiel, la coagulation est rapide, en masse ; puis, le caillot se contracte, devient spongieux, criblé de cavités. Le petit lait surnageant est clair. Ici aussi, la culture dégage une odeur acide butyrique. D'ailleurs, si l'on a eu soin d'ajouter du tournesol, on se rend mieux compte de l'acidité du milieu.

Le bacille perfringens fermente le glucose, le lévulose, le galactose, le saccharose, le maltose, le lactose, le raffinose, l'amidon, la dextrine et l'inuline.

Dans ces milieux sucrés, le dégagement du gaz est considérable. C'est un agent protéolytique très énergique. Il produit de l'hydrogène sulfuré.

Il possède également un pouvoir lipolytique, noircit le blanc d'œuf cuit et surtout produit des ferments réducteurs.

Avec un milieu à base de chlorure de fer, THÉMANN prétend obtenir un virage en deux à 10 heures.

Cette propriété, comme nous allons le voir, a été utilement mise en pratique pour sa recherche dans les eaux d'alimentation.

Sans vouloir insister outre mesure sur les propriétés de ce germe, résumons-nous en disant que nous le reconnaîtrons d'après sa morphologie (gram +), son aspect en gélose Veillon, son action sur le lait non écrémé, sur bouillon peptoné à 3 % contenant un petit cube de blanc d'œuf cuit, enfin d'après ses propriétés réductrices.

Etude des Anaérobies dans les eaux d'alimentation

Si beaucoup d'auteurs estiment utile la recherche des germes anaérobies dans les eaux, peu d'entre eux reconnaissent posséder un bon critérium de différenciation. Le problème dont nous nous occupons est donc double.

1°) D'une part, possède-t-on un processus d'identification sûr du bacille perfringens par une technique relativement simple ?

2°) D'autre part, la présence de ce germe dans l'eau a-t-elle un réel intérêt ?

Ce sont à ces deux questions que nous nous proposons de répondre.

I. - Méthode de culture - Principes généraux

Dès que l'on veut s'adonner spécialement aux recherches sur les microbes anaérobies, on se heurte le plus souvent à de nombreuses difficultés dues la plupart du temps à la diversité des moyens usités en vue de cette étude.

Aussi, nous contenterons-nous de signaler seulement les principales recherches pouvant être susceptibles de nous aider.

Le bactériologiste éprouve souvent beaucoup de peine à se retrouver dans ce grand chapitre de l'anaérobiose et nous avons tenu, avant de commencer l'étude proprement dite de notre sujet, à lui signaler les différents moyens techniques dont il dispose pour la recherche de ces germes.

Pasteur découvrit les anaérobies en examinant une goutte de liquide en fermentation butyrique. Il remarqua que les bâtonnets placés au bord de la préparation devenaient rapidement immobiles, alors que les autres continuaient à se mouvoir.

Après de nombreuses attaques de la part de ses adversaires et après avoir lui-même revisé son propre jugement, il dit, dans sa troisième réponse à M. Berthelot ce qu'il entendait par l'être anaérobie : « Il fait la chaleur, dit-il, dont il a besoin, en décomposant une matière dite fermentescible susceptible de dégager la chaleur par sa décomposition. »

Ses travaux, repris par ses élèves, montraient en réalité que la conception de l'anaérobiose était une conception physiologique. La vie aérobie se différencie de la vie anaérobie par le fait que dans

le premier cas il y a fixation de l'oxygène sur la matière assimilable, alors que dans le deuxième cas il y a dégradation de la matière fermentescible.

L'oxygène empêche cette fermentation.

Il résulte de ces définitions que dans le problème de l'anaérobiose, on doit chercher, d'une part, à protéger les milieux de culture contre la rentrée de l'air et, d'autre part, à libérer de l'hydrogène qui est nécessaire à la vie des microbes anaérobies, par des phénomènes d'oxydo-réduction.

A) *Isolement de la culture vis-à-vis de l'air.*

Pour les cultures en milieu liquide, le tube d'I. Hall (1915), le ballon de M. Gory et A. Jaubert (1933), sont trop connus pour que nous nous attardions sur leur description. C'est le tube d'I. Hall qui nous a servi dans notre expérimentation à repiquer les colonies obtenues à partir des eaux ensemencées. Signalons que lorsque la colonne de liquide est suffisante, nous avons obtenu des résultats identiques, que la bille de verre soit présente ou non.

Pour la culture en milieu solide, nous signalons pour mémoire les procédés de R. Koch (1881), Sanfelice (1888), qui recouvrent le milieu coulé sur boîte de Pétri par un isolant, celui-ci étant pour la circonstance une couche de mica. Mais que ce soit O. Streng (1903), avec son procédé à la boîte de Pétri renversée, Marino, Tédeschi, Th. Wenzel, etc..., tous cherchent à isoler de l'air, la gélose.

Le procédé le plus courant et le plus employé actuellement, consiste à couler sur la gélose ensemencée une même couche de cette gélose liquide stérile.

Mais nous préférons la méthode d'ensemence-

ment en gélose profonde qui donne, en supprimant toutes les manipulations secondaires, un parfait isolement et une lecture aussi facile que par la boîte de Pétri.

Quant au repiquage des colonies nées en gélose profonde, il est rendu facile par le procédé suivant : on enfonce complètement une pipette Pasteur ouverte fixée à un caoutchouc en suivant la partie latérale du tube ; celui-ci étant à la verticale, l'ouverture regardant vers le bas, on chauffe légèrement le fond à la flamme du bec Bunsen, puis on souffle dans le caoutchouc. La gélose se décolle. Doucement, on laisse tomber ce boudin de gélose dans une boîte de Pétri stérile. Il est alors facile d'aller chercher les colonies qui intéressent le manipulateur.

Dès maintenant, nous signalerons que le procédé à la gélose profonde a été généralisé par Veillon et ses élèves qui font bouillir pendant vingt minutes les tubes de gélose nutritive glucosée à 2 ‰, pour enlever l'oxygène et régénérer le milieu ; on laisse refroidir jusqu'à environ 40°, on ensemence avec une pipette Pasteur stérile fermée, on plonge immédiatement le tube dans un bocal d'eau froide jusqu'à solidification de la gélose ; on met à l'étuve à 37°.

Cette technique est parfaite pour l'isolement des germes et c'est ce principe que nous avons adopté.

B) *Extraire l'oxygène du milieu* est la deuxième difficulté à laquelle se heurte le bactériologiste dans la culture des anaérobies.

Parmi les moyens physiques il faut citer surtout, outre l'antique cloche à vide de L. Martin, l'appareil de Novy, *le tube de* Vignal, la boîte d'Arens et de Bagensky.

Mais nous nous attarderons surtout sur les moyens chimiques mis à notre disposition.

Dès 1888, Buchner utilise un procédé très pratique qui consiste à cultiver les microbes anaérobies dans une atmosphère dont l'oxygène est absorbé par la combinaison de l'acide pyrogallique avec de la soude ou de la potasse.

Le procédé est le suivant :

Dans le fond d'un grand tube à essai on ajoute de l'acide pyrogallique et de la potasse à un pour dix.

Depuis, la méthode basée sur l'emploi de l'acide pyrogallique a subi de nombreuses modifications.

Les auteurs se sont ingéniés à varier les techniques. Les uns, tels H. Wright (1901), Turro (1902), Kamen (1903), Stuler (1904), mettent le mélange (acide pyrogallique plus potasse) dans le même récipient que le milieu.

Le procédé de Schœntensack (1930), modifié par Inoué (1935), consiste à introduire un petit tube de verre contenant le mélange acide pyrogallique plus carbonate de sodium dans le tube de gélose incliné.

D'autres, tels Slupsky, Tadasu, Saiki, R.S. Spray, etc..., séparent nettement le mélange acide-potasse du milieu de culture.

A côté de ces milieux à base d'acide pyrogallique, Pasteur avait déjà, en 1863, imaginé de créer l'anaérobiose en absorbant l'oxygène par un microbe aérobie. Etudiant la fermentation du tartatre de cuivre par le vibrion butyrique, il remarque que les organismes aérobies enlèvent l'oxygène dissous et permettent après 24 à 36 heures le développement de germes anaérobies qui produisent la fermentation du tartate de cuivre.

Roux applique le même principe avec le bacille tétanique.

Dans le même sens, signalons les travaux de Debrand (B. tétragène et subtilis), Van Ermenghem (bacille botulinique et tétragène), Rhein (bacille botulinique et bacille fœcalis alcaligènes), Marino (anaérobies-champignons).

Actuellement, tous ces procédés sont peu employés. Mais ils ont servi de base à l'utilisation de l'absorption de l'oxygène par un aérobie pour obtenir un anaérobie, mais les deux germes ne sont plus mélangés l'un à l'autre. C'est le *procédé de* Fortner.

Une boîte de gélose au sang est séparée en deux parties :

— une partie est ensemencée avec un aérobie facultatif ;

— une autre partie est ensemencée avec un anaérobie strict.

L'aérobie enlève l'oxygène du milieu et permet à l'anaérobie de se développer.

D'autres auteurs ont imaginé de soustraire l'oxygène en incorporant un fragment de tissu d'origine animale. C'est le procédé de Tarozzi. L'auteur emploie des milieux renfermant des fragments de tissus fraîchement excisés sur un animal bien portant. (Le tissu conjonctif serait contre-indiqué).

On ajoute ces différents tissus à du bouillon ou à de la gélose ordinaire. Les tubes sont laissés un ou deux jours à l'étuve. Ces milieux sont préparés extemporanément. La question a été reprise par Harras qui stérilise sans modifier le pouvoir d'anaérobiose.

D'autres enfin, partent de tissus d'origine végétale, tels Douglas, Fleming, Colenbrook qui ajoute

des fragments de carotte, pomme de terre ; mais en ajoutant également des substances poreuses inertes (craie, coton, amiante, papier buvard), ils obtiennent le même résultat. L'adjonction de ces substances poreuses inertes a obtenu la faveur des auteurs, car ANTONA remarqua un phénomène identique avec le milieu suivant : bouillon 8 centimètres cubes et 0 gr. 50 de fer pulvérisé stérilisés à 170 degrés une demi-heure et additionnés de glucose à 1 %. Les cultures sont abondantes, même en présence d'air.

La technique a été reprise récemment avec un milieu à base de copeaux de fer pour réaliser une culture en anaérobiose.

Cependant, tous ces milieux que nous venons d'énumérer ont été l'objet de critiques, en particulier de la part de WEINBERG. Les auteurs ne précisent pas la quantité de culture qui a servi à l'ensemencement ni l'âge de celle-ci. Or, on sait fort bien qu'une souche microbienne anaérobie adaptée par de nombreux passages aux milieux de cultures usuels, ensemencés sous forme de culture jeune et assez abondamment, est susceptible de donner un développement très marqué dans des tubes de bouillon ordinaire dont on ne s'est nullement préoccupé de soustraire l'oxygène.

Justement, dans le cas qui nous intéresse, nous ne savons pas la quantité de microbes anaérobies contenus dans l'eau à analyser. De plus, nous avons à faire à un germe neuf qui demandera pour se développer un milieu qui lui apportera ce qui est strictement nécessaire à sa vie.

C'est pourquoi d'autres milieux ont été préconisés, milieux hautement spécifiques de la culture en anaérobiose.

Ils ont pour base, la cystéine, l'acide pyruvique, l'acide ascorbique.

Milieu à la cystéine :

Il a été utilisé par Hosoya Seigo, Valley, Frei et Riedmuller, qui opèrent de la manière suivante: la cystéine est ajoutée au moment de l'emploi au milieu chauffé à 70 degrés. Après son addition, il se produit un trouble par acidification, on ramène à $ph = 7,4$, on stérilise trois-quart d'heure dans la vapeur sous pression.

En gélose glucosée profonde on obtient d'excellents résultats : le bacille perfringens, œdématiens, botulinus poussent bien.

Outre la cystéine, on a utilisé son composé : le glutathion ainsi que l'amide thioglycolique et sa forme disulfide : l'acide dithioglycolique, acide thiacétique, acide glutamique, acide amarique, acide fumarique, xanthine et sulfite de soude.

Ciani, en 1920, ensemence le germe anaérobie dans de la gélose fondue glucosée additionnée de sulfite de soude ; on coule cette gélose dans une boîte de Pétri de manière à obtenir une couche de 1 à 2 centimètres d'épaisseur ; on solidifie rapidement, puis on coule sur cette première couche une deuxième de la même gélose d'une épaisseur de 6 à 8 millimètres.

P. Manteufeul ajoute au milieu 0,5 centimètres cubes d'une solution à 0,5 % de sulfite pour 10 centimètres cubes de milieu et recouvre de vaseline.

Vardon ajoute 3 centimètres cubes d'une solution fraîchement préparée de sulfite de soude à 10 % pour 100 centimètres cubes de gélose desséchée et reprise par l'eau.

Les Américains préconisent un milieu au thioglycolate de sodium qui serait supérieur aux milieux précédents. D'après des études récentes, Brewer préfère le mercaptœthanol qui est encore plus efficace pour la pousse des anaérobies.

Milieu à l'acide pyruvique :

Il a été préconisé par A. Berthelot.

L'acide pyruvique est une substance réductrice qui peut être employée pour la culture en anaérobiose en tubes ouverts.

Dans un tube à essai, l'auteur met du bouillon Martin auquel il ajoute 0 gr. 25 de pyruvate de potassium en solution aqueuse stérilisée par trois chauffages de 15 minutes à 100 degrés.

Signalons, enfin, qu'on a préconisé comme bon agent d'anaérobiose, l'*acide ascorbique.*

K.-H. Busing, à ce sujet, obtient la multiplication rapide des anaérobies les plus exigeants avec du bouillon peptoné ordinaire additionné de 1 à 2 % d'une solution de sel de sodium de l'acide ascorbique à 5 %. Le milieu convient également pour le rajeunissement des souches.

On a parlé aussi de sulfure de calcium et d'après M. Nicolle, quelques traces suffiraient pour obtenir la pousse d'anaérobies stricts.

Sur cette vue d'ensemble des méthodes proposées pour la culture des anaérobies, résumons-nous en disant qu'on a cherché avant tout à raréfier le milieu en oxygène libre.

Parmi les meilleurs procédés, seuls ceux basés sur l'emploi de substances réductrices (cystéine, sulfite de soude, acide pyruvique, acide ascorbique) méritent le crédit qu'on leur a accordé.

Faciles à préparer, ils augmentent le potentiel de la culture, mais quoiqu'on en dise, ils n'empêchent pas la pousse des anaérobies facultatifs.

Il nous resterait maintenant pour terminer cette revue générale, à signaler quelques-uns des supports alimentaires utilisés pour obtenir un meilleur rendement de la pousse des germes.

En réalité, ces germes anaérobies n'ont pas comme le bacille diphtérique un milieu spécifique. Cependant, il faut dire l'intérêt des bouillons Martin, des milieux à la viande, au blanc d'œuf et surtout au lait. Citons le milieu de Hamilton au lait tournesolé, le milieu de Kovacs et Ehrlich pour observer simultanément la peptonisation, la coagulation du lait et la formation éventuelle de sulfate ferrique. Ce milieu comprend du lait tournesolé à 7 %, des morceaux de foie et 0,05 gr. de sel de Mohr.

Signalons un milieu à la gélatine comprenant de la gélatine à 10 et 15 % additionnée de 3 % de glucose et de tournesol.

Prévot-Taffaud, Raynaud, ont préconisé un milieu au bouillon de placenta humain. Toutes les souches anaérobies poussent bien, rapidement et abondamment ; la fermentation y est tellement rapide et violente qu'il faut diluer d'un quart pour éviter le débordement des mousses. Les géloses obtenues à partir de ce milieu sont claires.

En résumé, disons franchement que pour notre expérimentation, nous nous sommes bien trouvés des milieux suivants :

— bouillon nutritif en tube d'I. Hall,
— gélose Veillon,
— milieu au lait,
— bouillon peptoné 3 % contenant un fragment de blanc d'œuf cuit.

II - Techniques spéciales proposées en vue de l'identification des germes anaérobies dans l'eau.

Ces techniques, d'une manière générale, peuvent se diviser en deux groupes :

1°) Les unes, les plus importantes, utilisent certaines des propriétés biologiques des germes permettant d'obtenir avec un minimum de manipulations une identification sûre ;

2°) Les autres, les premières en date, cherchent à obtenir une culture par quelques-uns des moyens dont nous avons parlé plus haut.

Nous étudierons tout d'abord ce deuxième groupe.

H. VINCENT, préconisant la recherche des anaérobies, utilise le tube de Vignal. L'eau à analyser est ensemencée dans le milieu suivant :

gélatine	100 à 200 gr.
glucose	10 gr.
chlorure de sodium	5 gr.
glycérine	5 gr.
eau	1.000 gr.

ou encore :

gélatine	50 à 75 gr.
glucose	5 gr.
glycérine	5 gr.
bouillon de viande peptonée	500 cc.

Ce milieu est réparti en tube à essai à raison de 10 centimètres cubes par tube. On stérilise à 100 degrés. Au moment de l'emploi, après refroidissement à 36 degrés, on ajoute 1 centimètre cube

de sulfoindigotate de soude à 2 % stérile. On ensemence alors l'eau à analyser à la dose de 1/10me de centimètre cube à 1 centimètre cube. On mélange et on aspire jusqu'à épuisement dans les tubes de Vignal (longues pipettes stériles de 50 centimètres de long et 3 à 4 millimètres de diamètre). Une des extrémités est étirée en pointe que l'on casse pour aspirer par l'autre ; celle-ci a subi également un commencement d'étirement pour faciliter après remplissage le scellement à la lampe des deux pointes. On porte à l'étuve à 20 degrés puisque le milieu contient de la gélatine. L'auteur ne relève que les colonies floconneuses ou faiblement granuleuses. Ces colonies seules seraient des anaérobies stricts.

A ces milieux, nous opposerons que l'interprétation peut être difficile et que l'importance des anaérobies facultatifs (protéus et colibacille en particulier) risquent de fausser les résultats. Il s'en suit d'ailleurs des manipulations secondaires pour vérifier l'identification toujours douteuse de ces colonies.

Guillemard, en 1906, imagina un procédé ingénieux pour l'obtention des germes anaérobies de l'eau.

L'auteur utilise une pipette de 25 centimètres de long et 8 millimètres de diamètre, effilée à sa partie inférieure et étranglée à sa partie supérieure.

Il conseille alors de liquéfier la gélose, de l'ensemencer à 38°-40° avec l'eau que l'on veut analyser diluée en proportions convenables ; on flambe ensuite la pipette puis on la rattache à l'appareil à hydrogène ; on fait passer un courant rapide de gaz, puis on ferme la pince et l'on place la pipette

dans le tube de culture où on la cale avec du coton ; on ouvre doucement la pince de façon à faire passer un courant continu d'hydrogène, en évitant toutefois les bulles de gaz trop fortes.

Après quelques minutes de barbotage, on ferme le robinet du gazogène et on ouvre celui du flacon de niveau et lorsque la culture a rempli la pipette on scelle l'effilure et l'étranglement à la flamme ; on porte à l'étuve à 37 degrés.

Les anaérobies poussent rapidement.

Nous n'avons pas expérimenté cette méthode. Elle exige un matériel compliqué et ne peut s'expliquer que dans un laboratoire spécialisé. La manipulation en paraît délicate et minutieuse. C'est la raison pour laquelle nous préférons le deuxième groupe de méthodes que nous allons exposer.

Les unes utilisent une des principales propriétés biologiques des germes anaérobies : la coagulation du lait.

On prend 1 centimètre cube de chaque dilution (1/10, 1/100, 1/1.000) de l'eau souillée qu'on étudie et on les met dans trois tubes de lait stérile qu'on chauffe au bain-marie à 80 degrés pendant quinze minutes ; on les couvre ensuite avec une couche d'huile de vaseline stérile ; on porte à l'étuve à 37 degrés pendant 2 à 5 jours ; la fermentation du lait, comme nous le disons dans un précédent chapitre, est caractéristique.

Ce procédé sûr présente l'inconvénient de la lenteur avec laquelle s'opère la coagulation du lait (à partir de la 48^{me} heure).

Aussi, le milieu-type pour la recherche des anaérobies dans l'eau est basé sur l'emploi de substances détectrices qui permettent facilement et rapi-

dement (48 heures au maximum) de déterminer le nombre d'espèces anaérobies stricts.

Neuberg et Nord, en 1919, ont montré que le bacille perfringens réduit le sulfite de soude en sulfure.

Wilson et Blair, en 1924, appliquent cette propriété commune à la plupart des anaérobies pour la recherche de ces microbes dans les eaux d'alimentation. Ils emploient le milieu suivant :

— à 100 centimètres cubes de gélose nutritive glucosée (gélose à 3 %, glucose à 1 %), on ajoute :
— 1 centimètre cube de solution aqueuse de perchlorure de fer à 8 % ;
— 0,6 centimètres cubes de solution de soude à 10 % ;
— 10 centimètres cubes de solution de sulfate de soude anhydre à 20 % ;
— on ajoute ces différentes solutions à la gélose fondue ;
— on prend 40 centimètres cubes du milieu ainsi préparé et on ajoute tant qu'il est bien chaud 20 centimètres cubes d'eau à analyser ; on mélange bien et on coule dans une boîte de Pétri.

On attend que le mélange soit bien solidifié, puis on le recouvre avec une couche de la même gélose mélangée d'eau stérile. Cette deuxième couche a pour but de protéger contre l'action de l'air les anaérobies qui pousseraient à la surface de la première couche.

Des colonies noires se produisent dans ce milieu au bout de 24 à 48 heures d'incubation à 37 degrés.

Les grandes (5 millimètres) et les moyennes colonies (3 à 5 millimètres) sont généralement celles du bacille perfringens.

Les autres colonies (1 à 3 millimètres) sont des anaérobies intestinaux.

Wilson et Blair pensent que le nombre de colonies noires indique la qualité d'une eau. Ils concluent ainsi :

— eau très pure : 0 colonie noire ;
— eau potable : 4 colonies au maximum ;
— l'eau filtrée sur sable ne doit contenir qu'une colonie au maximum.

Nous avons essayé cette technique que nous empruntons à la *Revue d'Hygiène* d'avril 1931.

Le repiquage des colonies noires ne nous a pas toujours révélé la présence d'anaérobies stricts. Les différentes espèces de protéus donnent une réduction du sulfite. C'est là une cause d'erreur importante. L'étalement sur lame des colonies noires nous révélaient souvent à côté de gros bâtonnets gram + de gros diplocoques gram — qui, repiqués sur bouillon en tube d'I. Hall, donnaient des bâtonnets gram — mobiles avec les caractéristiques d'un protéus si l'on faisait une galerie de culture complète.

Il faut de plus, dans cette technique, avoir à sa disposition de grandes boîtes de Pétri et une gélose de forte concentration (ce qui n'est pas le cas de la gélose couramment employée).

Aussi, le milieu de Wilson et Blair a-t-il subi de nombreuses modifications.

Elles portent surtout sur la simplification de la technique.

V. Marino proposa la technique suivante :

Il utilise des tubes de gélose profonde, il mélange le milieu de Wilson et Blair avec des quantités déterminées d'eau suspecte (5 centimètres cubes).

chauffée préalablement 10 minutes à 80 degrés pour détruire les formes végétatives. Nous nous permettons d'insister sur ce point qui nous semble capital, le bacille perfringens résistant, nous l'avons déjà dit, à des températures de cet ordre, alors que le protéus, par exemple, sera détruit par un simple chauffage à 65 degrés durant 3 minutes.

Après refroidissement, Marino recouvre la gélose ensemencée d'une couche du même milieu (environ 1 centimètre) ; au bout de 48 heures, il compte les colonies noires.

En conclusion, V. Marino constate que l'eau des sources profondes ne contient pas d'anaérobies et que l'eau potable des sources canalisées peut renfermer un à deux germes par centimètre cube. D'autre part, si l'eau de puits renferme un à cinq microbes anaérobies par centimètre cube, il faut la considérer comme suspecte. D'après Marino, elle est certainement souillée si elle contient plus de cinq germes par centimètre cube.

Nous tenons aussi à signaler une autre technique toujours basée sur la réduction du sulfite de soude et proposée par MM. Dienert et Guillerd.

De la gélose glucosée à 3 % de gélose et 2 % de glucose est, après préparation ($ph = 7{,}5$) répartie en gros tubes à essai par 20 centimètres cubes et stérilisée à 110 degrés pendant 15 minutes. Au moment de l'usage, on ajoute à 20 centimètres cubes de cette gélose préalablement fondue, 2 centimètres cubes de solution de sulfite de soude cristallisé à 20 % préparée le jour même et 4 gouttes d'alun de fer à 5 % non stérilisé. On mélange pour homogéniser et l'on maintient au thermostat à 60 degrés.

A ces 20 centimètres cubes de gélose, on ajoute 20 centimètres cubes d'eau à examiner, préalablement portée à 75-80 degrés pendant 5 minutes.

Le mélange est versé dans une boîte de Pétri que l'on dispose dans un endroit frais afin d'accélérer la prise de la gélose. Dès que celle-ci est obtenue, on coule à la surface de ce substratum une couche de 40 centimètres cubes de gélose de même composition que la précédente, mais dont la concentration en gélose aura été abaissée à 1,5 % par addition d'un volume égal d'eau stérile. Les boîtes ainsi préparées sont portées à l'étuve à 37 degrés où elles devront séjourner de 36 à 48 heures.

Les auteurs signalent qu'on peut réaliser avantageusement une simplification de la technique en portant directement à l'étuve à 37 degrés la gélose, plus l'eau à examiner que l'on aura mis à refroidir dans un courant d'eau froide.

Nous inspirant de cette technique, nous avons réalisé ainsi notre expérimentation.

Nous utilisons la gélose courante du laboratoire (gélose à 2%) glucosée à 1 % également liquéfiée, nous la coulons dans des tubes à essai de 35 millimètres sur une hauteur de 8 centimètres environ (ce qui correspond à 20-25 centimètres cubes de gélose).

Nous opérons ensuite la stérilisation à 110 degrés pendant 15 minutes. Au moment de l'emploi, on porte le tube au bain-marie bouillant pendant 20 minutes, on laisse refroidir à 60 degrés. On ajoute 10 à 12 gouttes d'une solution fraîche de sulfite de soude à 10 % et 4 gouttes d'une solution de chlorure ferrique à 8 %.

La préparation de ces solutions ne présente aucune difficulté.

Il est nécessaire d'avoir une solution de sulfite récente étant donné son instabilité.

Aussi, le jour de l'analyse fait-on dissoudre dans un tube à essai 10 centimètres cubes d'eau distillée stérile bouillante avec un gramme de sulfite. L'eau chaude favorise la dissolution.

La solution de chlorure ferrique ne doit pas être stérilisée ni portée à l'ébullition pour éviter la précipitation d'hydrate ferrique.

Lorsqu'on ajoute à la gélose fondue quelques gouttes de solution de Cl^2 Fe^6, il se forme un précipité marron. Il suffit de quelques mouvements de centrifugation à la main pour en obtenir la dissolution.

A ces 20 centimètres cubes de gélose ainsi préparée, on ajoute 10 centimètres cubes d'eau à analyser, préalablement plongés dans un bain-marie à 80 degrés pendant 5 minutes ; on favorise le mélange par quelques mouvements de centrifugation manuelle et on plonge dans un bac d'eau froide pour accélérer la prise de la gélose; on porte ensuite à l'étuve à 37 degrés ; on lit 12 heures, 24 heures, 48 heures après.

Sur ce milieu, nous trouvons des colonies noires de 6 à 10 millimètres de diamètre. Quelquefois, on voit de grosses colonies envahissantes siégeant soit dans la partie haute de la gélose, soit près des parties latérales ; il ne faut pas en tenir compte en général. Cependant, on peut faire une

vérification par le gram et le repiquage sur lait et gélose Veillon.

Les anaérobies obtenus et correspondant aux colonies noires sont presque exclusivement des anaérobies stricts appartenant à l'espèce perfringens.

Il est préférable de faire une lecture dès la douzième heure, car si l'eau est abondamment souillée, il sera, dès ce moment, possible de compter les colonies.

Nous avons ainsi, par l'énumération de ces différentes techniques, répondu à la première question que nous nous étions posée: Possède-t-on un moyen sûr d'identification du bacille perfringens dans l'eau d'alimentation ?

Oui, ce moyen existe, il est possible d'obtenir des cultures isolées d'anaérobies stricts.

Nous en arrivons donc à répondre maintenant à la deuxième interrogation : La présence du bacille perfringens et plus généralement des anaérobies dans les eaux, a-t-elle un réel intérêt et peut-elle se placer sur le même plan que la recherche du colibacille ?

Intérêt
de la recherche du B. Perfingens
dans les eaux d'alimentation

On sait que le but de l'analyse bactériologique de l'eau est de savoir si elle renferme des germes pathogènes capables de provoquer la maladie chez l'homme.

Cependant, avant d'interpréter les résultats de cette analyse, on peut se demander si ces germes tirent leur pouvoir pathogène de leur espèce ou de leur nombre. On est obligé d'avouer qu'il s'agit d'une question complexe à laquelle on n'a pas pu encore donner une réponse sûre. Mais on sait, par contre, que ces microbes modifient considérablement leurs propriétés dans l'eau ; c'est, en effet, un très mauvais milieu de culture pour eux. Elle n'est pas favorable à la prolifération des germes de maladies d'origine hydrique. Dans l'organisme, ceux-ci se développent facilement grâce aux corps organiques complexes qu'ils y trouvent. Aussi, leur

recherché dans un liquide physiologique quelconque, au cours d'une maladie, est-elle beaucoup plus facile que dans une eau souillée. Car, dès qu'il se trouve dans l'eau, le microbe pathogène est aux prises avec d'autres germes mieux adaptés que lui aux exigences du milieu, qui vont se développer beaucoup plus rapidement et, finalement, rendront difficile sa découverte. C'est sur ce point, justement, que l'analyse bactériologique présente de l'intérêt, car ce germe, en petit nombre, masqué par une flore microbienne plus ou moins saprophyte, n'est pas toujours inoffensif pour celui qui consommera l'eau.

Evidemment, comme nous le disions au début de ce chapitre, la question de la virulence du germe suspect est mal posée. Pour certains bactériologistes, seule une eau renfermant un nombre élevé de bacilles pathogènes est dangereuse pour l'individu.

Mais la pratique a montré que les épidémies peuvent se développer avec des eaux renfermant peu de germes pathogènes. Devant ces imprécisions, on a recherché des méthodes permettant, malgré tout, de savoir indirectement si un microbe dangereux peut arriver à souiller une eau. Certaines bactéries ont des propriétés physiologiques à peu près semblables à celles des germes des maladies d'origine hydrique. C'est le cas, entre autres, du colibacille, du protéus, de l'entérocoque. Mais ces microbes présentent, en outre, un réel intérêt puisque l'organisme humain les héberge constamment. Chez l'enfant, peu de jours après la naissance, on trouve des bacilles coliformes qui ne quitteront son intestin qu'après sa mort.

La présence de ces germes dans une eau révèle son impureté. Mais le problème reposait également sur l'identité très voisine de leurs propriétés avec le bacille d'Eberth, et les bacilles dysentériques. Ce n'était donc plus les microbes responsables des maladies hydriques que l'on recherchait, mais d'autres, vivant également très mal dans l'eau, aussi peu résistants que le bacille d'Eberth par exemple, mais plus abondants que ce dernier et qui permettraient de déterminer la qualité de l'eau.

Le bacillus coli comme le bacille entéristis disparaissent peu à peu à mesure qu'ils séjournent dans l'eau et l'analyse bactériologique est basée sur le fait qu'une eau est d'autant plus dangereuse à la consommation que la contamination est plus récente.

Supposons donc le schéma suivant :

Une eau est souillée en un certain point, peu à peu elle chemine à travers des terrains variés. Mal adaptés à ce milieu, les germes seront arrêtés par la filtration et l'eau souillée se purifiera lentement.

Il arrivera un moment où la teneur en colibacille révélée par l'analyse sera faible. C'est ce que nous traduirons en disant qu'il s'agit d'une contamination ancienne.

Mais certains germes pathogènes résistants peuvent continuer à vivre.

Krauss a examiné les eaux usées d'un sanatorium. L'auteur a trouvé dans les prés, les terres avoisinantes, le bacille de Koch.

Les animaux qui broutaient l'herbe présentaient des lésions tuberculeuses.

La résistance du bacille de Koch est considérable et sa présence fut décélée longtemps dans les parages du sanatorium.

Or, nous ne savons pas, nous le disions plus haut, dans quelle mesure le nombre des germes pathogènes influe sur la qualité de l'eau.

H. Violle et J. Fricker partent de l'idée que la colimétrie est insuffisante pour apprécier la nocivité d'une eau potable et que le principal danger d'une eau contaminée repose sur le fait de véhiculer le bacille d'Eberth dont la survie est variable (suivant le *ph*, le taux des matières organiques, les germes antagonistes) ; ils ont montré qu'il n'existe aucun rapport entre la persistance du bacille d'Eberth et le taux de la colimétrie.

C'est dans l'application de cette idée que réside à notre avis, l'intérêt des germes sporulés de l'intestin ; l'organisme humain recèle, nous en avons déjà parlé, des microbes anaérobies du type perfringens. Germe sporulé, hôte normal de l'intestin, il peut indiquer longtemps l'indice de pollution d'une eau d'alimentation, parce que beaucoup plus résistant que le colibacille.

La recherche du bacille perfringens nous sera utile à un double point de vue.

Si certaines maladies encore inconnues peuvent se propager par l'eau, et si les germes qui en sont l'origine sont des germes sporulés par exemple, le critérium actuel, basé sur la recherche du colibacille, est insuffisant.

Mais surtout, cette méthode paraît être un précieux appoint permettant de pousser plus loin l'investigation microbienne.

On admet « qu'une eau suspecte renferme des germes frais, qu'elle ne peut être dangereuse que

s'il s'écoule peu de temps depuis l'admission du germe pathogène, son cheminement dans la nappe et sa réapparition dans l'eau d'alimentation. » (Diener).

S'il s'agit donc d'une contamination ancienne, le colibacille se raréfie de plus en plus. Mais on peut alors se demander si on a le droit de répondre qu'une eau, contenant vingt colibacilles au litre, peut être consommée sans danger pour l'individu, si l'on admet la notion du coli d'origine fécale. Il serait plutôt logique, pour continuer à déceler sa présence, d'augmenter la quantité d'eau destinée à rechercher les causes de la contamination. Ce qui, en général, n'est jamais pratiqué. Aussi, dans un cas semblable, pourrait-on étudier dans un même volume d'eau que celui employé pour la numération du colibacille, les germes anaérobies, puisque plus résistants que le bacille d'Eberth, le bacille dysentérique, le V. cholérique : ils continueront par leur présence à nous indiquer l'indice de pollution.

M. Dienert remarque que parfois le bacillus coli ne peut être décelé dans certaines eaux suspectes, voire certainement souillées, en particulier l'eau de pluie. Admettant que le bacillus coli a une origine fécale, il doit s'accompagner des microbes commensaux de l'intestin.

Il y aurait donc intérêt, remarque l'auteur, à rechercher en même temps que le bacille du Colon, d'autres germes de la flore intestinale.

Nous basant sur l'examen de cinquante eaux d'alimentation pratiqué au hasard de leur arrivée au laboratoire, nous avons dressé un tableau comparatif des résultats que nous avons trouvés.

EAUX à analyser	RECHERCHE du Colibacille				RECHERCHE des Ananérobies
	METHODE de Dienert Procédé à l'eau phéniquée	BACTERIES putrides	NUMERATION en gélatine		NOMBRE de colonies noires pour 50 c/c d'eau
			liq.	non liq.	
1 Puits	120	+	160	120	16
2 Réservoir	20	—	8	16	2
3 Puits	160	++	124	3728	6
4 Source	0	—	9	15	3
5 Puits	1440	+++	90	1916	25 après 12 h.
6 Pompe municipale	1800	++	88	1440	23 après 12 h.
7 Source	2000	++	0	1444	7
8 Pompe municipale	60	+	7	14	1
9 Source	500	++	261	3000	10
10 Puits	300	++	126	2340	20
11 Puits	20	—	3	20	8
12 Source	0	—	20	7	1
13 Source	10	—	82	8	2
14 Pompe municipale	0	—	0	6	0
15 Puits	160	++	212	1800	3
16 Puits	1360	+++	12	980	15
17 Réservoir	720	++	50	470	6
18 Source	20	—	20	8	1
19 Pompe municipale	0	—	30	10	0
20 Rivière	240	++	12	1340	6
21 Rivière (après filtres)	40	—	26	680	2
22 Rivière	840	+	344	3200	7
23 Rivière (après filtres)	160	+	22	2160	5
24 Source	120	—	800	400	4
25 Source	600	+	456	3500	5
26 Ruisseau	360	+	13	moisissures	20
27 Source	20	—	0	150	0
28 Source	20	—	7	34	0
29 Puits	20	—	0	200	0
30 Source	0	—	0	17	0
31 Puits	360	++	215	1260	15
32 Source	2000	+++	80	640	25
33 Source	0	-	0	22	0
34 Puits	0	-	8	19	0
35 Puits	540	+	72	2700	6
36 Puits	1200	+++	98	3672	15
37 Puits	0	—	0	6	0
38 Rivière	1446	+++	dép. 10.000 ger. au cc.		25 après 12 h.
39 Rivière	1400	+++	»		26 après 12 h.
40 Rivière	1600	+++	»		20 après 12 h.
41 Fontaine	100	+	760	370	4
42 Fontaine	20	—	30	12	2
43 Toulouse-ville	0	—	0	130	0
44 Toulouse-ville	0	—	0	18	0
45 Source	540	+	236	2800	6
46 Puits	1200	+++	dép. 10.000 ger. au cc.		16
47 Puits	40	—	5	12	10
48 Puits	1800	+++	dép. 10.000 ger. au cc.		25
49 Puits	800	++	70	580	5
50 Pompe	0	—	0	8	0

Nous avons pratiqué ainsi cinquante analyses d'eaux d'alimentation. Sur chaque échantillon, nous avons recherché le colibacille par la méthode de DIENERT, les bactéries putrides, et nous avons, en outre, étudié la numération des germes sur plaques de gélatine.

Numération des germes :

On introduit à l'aide d'une pipette de 1 centimètre cube, graduée en 1/10^{me} de centimètres cubes, 0,5 centimètre cube à analyser dans une boîte de Pétri et 0,1 centimètre cube dans une autre boîte.

On verse dans chaque boîte un tube de gélatine fondue après avoir flambé l'orifice du tube, on mélange par des mouvements de bascule et on laisse solidifier. On lit le nombre de colonies liquéfiantes et non liquéfiantes en utilisant les coefficients de Vincent.

Recherche du colibacille :

Avec une pipette de 10 centimètres cubes (en cinq fois), nous introduisons 50 centimètres cubes d'eau à analyser dans le ballon contenant 50 centimètres cubes d'eau peptonée déjà mesurée. Avec la pipette de 1 centimètre cube ayant déjà servi à la numération des germes, on prélève 1,5 centimètre cube d'acide phénique à 5 % et on les introduit dans le mélange ; on agite.

Avec la pipette de 10 centimètres cubes, nous introduisons 1 centimètre cube du mélange dans chacun des tubes à hémolyse ; puis 10 centimètres cubes dans chacun des tubes à essais. On met à l'étuve à 37°5 pendant 48 heures. Au bout de ce

temps, on fait la réaction à l'indol dans tous les tubes. Si la réaction est positive, il y a du colibacille.

Interprétation des résultats :

Supposons que les tubes à hémolyse n'aient pas poussé et qu'un seul tube à essai présente une réaction à l'indol positive ; on dit qu'il y a au moins un colibacille dans 50 centimètres cubes d'eau.

Si 5 tubes ont une réaction, nous dirons qu'il y a au moins 5 colibacilles dans 50 centimètres cubes d'eau. Si 9 tubes ont poussé, il y a au moins 9 colibacilles dans 50 centimètres cubes d'eau.

Si un tube à hémolyse présente une réaction à l'indol positive, chaque tube à essai est compté pour 10 colibacilles puisqu'il contient dix fois plus que le petit.

Pour le calcul définitif, on ramène au litre.

Signalons que nous avons recherché l'indol avec le réactif de Salkowsky.

Recherche des bactéries putrides :

Dans un flacon stérile, on introduit 30 centimètres cubes environ de bouillon au rouge neutre de composition suivante :

Extrait de viande	5 gr.
Sel	5 gr.
Peptone	10 gr.
Eau	1000 gr.
Rouge neutre	1 cc.

On ensemence 20 centimètres cubes d'eau à analyser.

On met à l'étuve à 37 degrés, on lit le virage du milieu au rouge neutre en comparant avec un

témoin. Suivant l'intensité de ce virage, on indique par des signes + (une, deux ou trois croix) la présence des bactéries putrides.

Nous avons le même jour, et c'était notre but principal, ensemencé l'eau suspecte dans le milieu pour anaérobies dont nous avons exposé la technique, page 39.

L'analyse porte sur 50 centimètres cubes. Comme nous n'ensemencions que 10 centimètres cubes par tube, nous avons distribué les 50 centimètres cubes successivement dans 5 tubes déjà préparés en vue de cette recherche.

Evidemment, nous n'avons pas eu l'intention, en nous basant sur le résultat donné par cinquante analyses, de conclure catégoriquement sur l'intérêt réel ou illusoire qu'il y a à rechercher les germes anaérobies dans les eaux d'alimentation. L'analyse bactériologique de ces eaux présente le plus souvent des difficultés considérables. On peut y trouver une quantité de germes banaux plus élevée que celle généralement admise dans les eaux potables. La recherche d'un moyen sûr d'identification des microbes pathogènes, nous l'avons déjà dit, a été et demeure le principal souci des bactériologiques s'occupant de la question, car nous ne possédons pas de critérium qui nous permette de déceler avec certitude une contamination.

La présence du colibacille autrefois considérée comme l'indice certain d'une souillure fécale, n'est pas suffisante.

Pour cette raison, on a été amené à chercher d'autres indices de pollution.

D'ores et déjà, par la recherche des microbes anaérobies, nous pouvons, en dressant le tableau ci-dessus, faire les remarques suivantes :

1°) Il existe une concordance absolue entre une souillure abondante révélée par la colimétrie et le nombre élevé des colonies noires anaérobies ;

2°) Sur les cinquante examens pratiqués, nous avons obtenu *deux fois* un indice très faible de nocivité de l'eau par la colimétrie et, par contre, un indice très fort par la recherche des anaérobies. Eau n° 11 et n° 47 (eau des puits) ;

3°) En ce qui concerne les eaux n°s 8, 18, 21, 24, 27, 28, 29, 42, nous avons trouvé une discordance apparente dans les résultats comparatifs des méthodes. En réalité, le chiffre des colibacilles oscillait entre 20 et 40. Ajoutons que, sauf l'eau n° 29, il s'agissait d'eaux de sources ou de rivières ;

4°) Une colimétrie négative a concordé avec une contamination par les anaérobies absents ou très faibles.

Nous pensons donc que les méthodes visant la recherche des germes anaérobies, tout en ne devant pas être utilisées seules, s'avèrent un appoint précieux pour l'analyse bactériologique totale de l'eau. Nous entendons par là l'association, telle que nous l'avons mise en pratique, de la colimétrie, numération des germes et étude des bactéries putrides.

Comment conduirons-nous l'analyse ?

Dès l'arrivée des eaux, on ensemence celles-ci en vue des recherches précédentes (50-60 centimètres cubes sont prélevés stérilement et chauffés cinq minutes au bain-marie bouillant pour l'ensemencement ultérieur en anaérobiose).

Au bout de 48 heures :

1°) Si la colimétrie révèle une forte contamination, nous sommes en présence d'une souillure récente. Les recherches des anaérobies ont peu d'intérêt puisque le nombre des colibacilles est largement suffisant pour incriminer l'impureté de l'eau. (Compte tenu des méthodes classiques visant à préciser l'origine fécale du colibacille) ;

2°) La colimétrie révèle un indice de pollution très faible : on compte alors les colonies noires obtenues dans les cinq tubes de gélose profonde. Si la recherche est positive, on devrait considérer l'eau comme impropre à la consommation ;

3°) La colimétrie est négative mais l'indice de la pollution révélée par la présence du bacille perfringens est positive. On devrait considérer cette eau comme suspecte puisqu'elle témoigne une contamination ancienne ;

4°) Enfin, si la colimétrie est négative et les anaérobies absents, l'eau est bonne pour la consommation.

Conclusion

Nos recherches ont consisté non seulement à résumer les travaux qui ont contribué à l'étude des anaérobies dans les eaux, mais encore à apporter une contribution personnelle à la question et à essayer de tirer une conclusion sur l'état actuel des recherches. L'analyse bactériologique des eaux se présente comme l'une des plus délicates applications de la bactériologie à l'hygiène. Le nombre des microbes contenus dans les nappes liquides varie énormément ; mais on peut dire que, sauf de rares exceptions, on en trouve toujours, et ce, d'autant plus que l'eau est plus souillée.

De plus, la constatation et l'abondance du colibacille s'avèrent comme un témoin précieux du degré de pollution des eaux.

Mais on doit attacher également une grande importance à la présence ou à l'absence d'autres espèces de l'intestin. La facilité avec laquelle les microbes anaérobies donnent des colonies mixtes, a entravé pendant longtemps leur étude dans les eaux d'alimentation.

L'obtention des colonies anaérobies stricts, fut discutée, mais le perfectionnement des procédés actuels d'isolement a permis de démontrer que cela était possible. D'autre part, la prépondérance des microbes anaérobies dans la flore intestinale est très importante; donc, toute eau contaminée par les microgermes des résidus de la vie n'échappera pas

à ce témoignage, qu'elle soit polluée directement par le sewage d'une ville ou indirectement comme peut l'être une rivière recevant les apports des pluies après leur ruissellement sur les sols souillés de détritus. Dès lors, la recherche des anaérobies de l'eau devient un témoignage aussi sûr que celle des autres bactéries intestinales. La preuve en est, nous l'avons vu, dans la concordance des résultats existants avec la colimétrie et portant sur des eaux polluées depuis peu de temps. Mais surtout, nous l'avons signalé, l'intérêt est accru avec des eaux dont la source de contamination est plus lointaine. Quoi qu'il en soit, la combinaison des deux méthodes (colimétrie et recherches des anaérobies stricts) nous paraît être un acheminement plus certain vers la reconnaissance de la qualité bactériologique d'une eau.

L'intérêt de la présence du bacille perfringens dans un tube d'eau ensemencée est qu'il porte *sur une espèce sporulée* et fournit par là un test que le colibacille ne pouvait donner.

C'est surtout dans les puits, les citernes, les conduites d'adduction, que son étude établira un parallèle utile et complétera la colimétrie.

Vu :
Le Président,
ANDRIEU

Vu :
Le Doyen,
CALVET

Vu et permis d'imprimer :
Toulouse, le 27 mai 1947
Le Recteur,
Président du Conseil de l'Université,
P. DOTTIN

Bibliographie

Ambrozioni (P.). — Sopra una particolare derivazione del « B. perfringeus » nelle acque. *(Ann. d'Ig.,* 1938, 461, résum. in *Bulletin Inst. Past.,* 1939, 1015).

Antona. — Terreno al ferro porfirizzato per la coltura dei battéri anaérobi in preseuza di aria. *(Gior. Batte Imm,* 1933, 11, 273 ; résum. in *m. anaérobies de Weinberg,* Nativelle, 1934, 34).

Brewer (J.-H.). — The use of various reducing agents in a thioglycalate type medium. *(Journal Bact.,* mai 1944, 47, 456).

Buchner. — Eine neue Méthode zur Kultur anaerober Mikroorganisme. (C.F.B., Or, 1888, 4, 149 ; résum. in *M. anaerobies de Weinberg,* 1934, 9).

Busing (K.-H.). — Askorbinsaüre und Anaeroben wachstun Zentralbl. (Bakt II Abt t. 103, 2-1 41, p. 70-72).

Ciani. — Culturo degli anaerobi nelle commune capsule Pétri in présenza di aria. *(Ann. Ig.,* 1920, 30, 274).

Debrand. — Sur un nouveau procédé de culture du B. tétanos. (A.I.P. 1900, 14, 257 ; 1902, 36, 427 ; résum. in *M. anaérobies de Weinberg,* 1934, 24).

Dienert.Guillerd. — Alimentation en eaux de ville. (1933)

Frei-Reidmuller. — Reduktionspotentiel und anaerobeuzüchtung. (R.F.B., Or, 1931 ; résum. in *M. anaerobies de Weinberg,* 1934, 28).

Fleming-Colebrook. — M. Res-Counc. (Rapport n° 57, 1920 ; résum. in. *M. anaerobies de Weinberg,* 1934, 33).

Foley-Maren. — Pure thioglycolates in culture. *(J. bact.*, juin 1944, 47, 580).

Fortner. — Zur technik der anaerober Züchtung. Zur differenzierung der anaerober. (C.f.B., Or, 1929, 110, 233 ; resum. in *M. anaerobies de Weinberg*, 1934, 26).

Guillerd. — Analyse bactériologique de l'eau. *(Ann. d'Hyg.*, 1927, 647 ; 1929, 129);

Guillemard. — La culture des m. anaérobies appliquée à l'analyse des eaux. *(Ann. Inst. Past.* 1906, 155).

Hall (I.). — Selective elimination of hay bacillus from cultures of obligate anaerobes. J.A.M.A., 1919, 72, 274; resum. in *M. anaerobis de Weinberg*, 1934, 38).

Henseval. — La recherche du « B. antéridis sporogènes » dans l'analyse bactériologique des eaux. *(Rev. d'hyg.*, 1913, 381).

Imbeaux. — Qualités de l'eau. (1935, 324).

JaubertGory. — Procédé pratique de culture anaérobie. *(Press. Méd.*, 1933, 1123).

Manteufeul. — Uber Anaerobenzüchtung. (C.f.B., 1923, 89, 248, 251 ; resum. in *M anaerobies de Weinberg*, 1934, 29).

Marino (V.). — Contributo alla ricerca dei germi anaerobi nelle acque potabili. *(Ann. d'Ig.*, 1934, 44, 960).

Neuberg-Nord. — Bioch Z. (1919, 96, 133).

Pasteur. — Sur les animaleules infusoires vivant sans oxygène libre et déterminant des fermentations. (C.R. A.S., 1861, 12, 267-273).

Prévot-Taffaud-Raynaud. — Etude d'un milieu sans viande : milieu au bouillon de placenta. *(Ann. Inst. Past.*, mai-juin 1944, 70-181-2).

Spray. — Demonstration of a simple anaerobi culture. (*Jour. of. bact.*, 1931, 21-23).

Streng. — Zür Züchtung der anaeroben Bakterien. (C.f.B., I, 1903, 34, 598 ; resum. in *M. anaerobies de Weinberg*, 1934, 13).

Turro. — Zur anaeroben Kultur. (C.f.B. I, 1902, 31, 175 ; resum. in. *M. anaerobies de Weinberg*, 1934, 10).

Tarrozzi. — Centrabalt f. Bakt I origin. t. XXXVIII, 15-4-1905, 619-623 ; in *Bull. Inst. Past.*, 1905, 505).

Themann. — Ueber einen einfachen und osehuellen Nachweis van Fraükeleschen gasbrand bazillen mit Hilfe einen Nährboden reaktion. *(Dtsch med. Wshn*, 31-3-1944, 70-182-3).

VEILLAN-ZUBER. — *Archiv. Med. Experimentale,* juillet 1898.

VINCENT (H.). — Sur la signification du bacillus coli dans les eaux potables. *(Ann. Inst. Past.,* 1905, 233).

VIOLE-FRICKER. — Un nouveau test bactériologique pour l'appréciation de la qualité des eaux de boisson : l'indice typhogène. (G.R., Paris, 4-10-1943, 217-328-30; resum. in *B. analyltique,* 5, 25, 970).

WILSON-BLAIR. — Conclution of the sulphite reduction test with other tests in the bacteriological examination of water. (*Journ. of. Hyg.,* 1925, p. III ; resum. in *Revue d'Hygiène,* avril 1931, tome LIII, 254).

WEINBERG-NATIVELLE-PREVOT. — Les microbes anaérobies, 1934.

ZYP-BRIDAKOV,MIOHNE. — Zür Frühdiagnose der durch B. perfringens hervorgerufenen gasbrandes. (*Wiatchebnaya Gazeta,* 1934 ; résumé in *M. anaerobies de Weinberg-Nativelle-Prevot,* 1934, 205).

Table des Matières

Introduction 11
Historique 15
Le Bacille Perfringens 19
Etudes des anaérobies dans les eaux d'alimentation 23
Méthode de culture — Principes généraux 24
Technique spéciale 33
Intérêt de l'étude 43
Tableau des résultats et interprétation 48
Conclusion 55

IMPRIMERIE
CLÉDER
28, rue de la Pomme
TOULOUSE